

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

BAKTERIJE KAO BIOLOŠKO ORUŽJE

BACTERIA AS BIOLOGICAL WARFARE

SEMINARSKI RAD

Ante Bunoza

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study in Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Hrenovi

Zagreb, 2011.

SADRŽAJ

1.Uvod.....	3
2.Povijesni pregled razvoja biološkog oružja	4
3.Bakterijske vrste kao biološko oružje	8
3.1. <i>Bacillus anthracis</i>	8
3.2. <i>Burkholderia</i> sp.	10
3.3. <i>Francisella tularensis</i>	12
3.4. <i>Rickettsia</i> sp.	14
3.5. <i>Coxiella burnetii</i>	16
4.Bakterijski toksini kao biološko oružje	17
4.1. Stafilokokni enterotoksin B.....	17
4.2. Botulinski toksin	18
5.Literatura.....	19
6.Sažetak	20
7.Summary	20

1 Uvod

Biološko oružje se najjednostavnije može definirati kao skup agenasa - bioloških patogena (kao što su bakterije, virusi, gljivice ili praživotinje), koji se koriste u svrhu ubijanja ili onesposobljavanja ljudi, nekih životinja ili biljaka. Ovi patogeni se razmnožavaju, odnosno u slučaju virusa umnožavaju, unutar domaćinskih organizama, i time izravnu ili neizravnu štetu tako što uzrokuju bolest napadaju i različit tkiva ili proizvode i toksine koji su štetni za zaražene pojedince. Toksini u ovom slučaju se ne ubrajaju isključivo u biološke, već i u kemijske agense pa kao takvi predstavljaju agense središnjeg spektra djelovanja (tj. između biološkog i kemijskog). Takvi agensi se ne razmnožavaju u domaćinima, a označuju ih i kraći inkubacijski periodi u odnosu na, primjerice, bakterije.

Ovakvi patogeni se po svome u inkubaciji mogu probati tako da uzrokuju bolest samo u određenim vrstama (primjerice ribe ili ljudi), odnosno da predstavljaju širu prijetnju različitim tipovima organizama odjednom. Patogeni usmjereni protiv životinja se najčešće upotrebljavaju za usmrćivanje životinja u stočarstvu, odnosno poljoprivredno važnih vrsta, npr. goveda, svinje i perad. Iako se takvi patogeni izabiru kako bi se usmjerili na to određenu vrstu, nije rijetkost da uzročnik bolesti prijeđe barijeru vrste, primjerice na ovjeka. U takvom slučaju vrlo je teško dijagnosticirati određeni tip bolesti, čak i medicinskom osoblju koje je prošlo posebnu obuku u egzotičnoj patologiji. Neki drugi patogeni koji uzrokuju bolesti biljnih, također poljoprivredno važnih vrsta, kao što su pšenica, kukuruz ili riža, nemaju potencijal za migraciju u životinjske vrste, tako da je moguća opasnost od takvih mikroorganizama za ljude ili životinje gotovo nepostojeća.

Oružja se općenito, pa tako i ona biološka, razvijaju kako bi se stekla strateška ili taktička prednost nad neprijateljem, bilo putem prijetnje ili stvarne uporabe istoga. Mogu se iskoristiti protiv pojedinca, neke specifične skupine ili čitave populacije, a razvijaju ga države (u sklopu određenih nacionalnih programa razvoja oružja – npr. “United States biological weapons program”, pokrenut u proljeće 1943.) ili potajno neke, najčešće teroristički orijentirane skupine.

Idealna obilježja nekog patogena koji bi se mogao upotrijebiti kao biološko

oružje su visoka stopa infektivnosti i virulencije, nedostupnost specifičnih cjepiva, odnosno određenog lijeka, zatim stabilnost (u smislu sigurne pohrane biološkog materijala koji može ostati infektivan i nakon dužeg vremenskog razdoblja; u ovom slučaju su idealne sporulirajuće bakterije), kao i uspješno i u inkubito širenje, tj. propagacija. Ovaj okvirni pregled različitih tipova biološkog oružja daje poseban osvrt na nekoliko najpoznatijih vrsta bakterija i toksina koji su uz njih povezani, njihovu uporabu u različite vojne ili terorističke svrhe te opasnosti koje one predstavljaju, kao i mjere zaštite i obrane.

2 Povijesni pregled razvoja biološkog oružja

Uvijek se koristio raznim otrovima u svrhu eliminiranja nepoželjnih pojedinaca ili čitavih vojski od pamtivijeka, međutim tek je temeljima koje su modernoj mikrobiologiji kao znanosti postavili Robert Koch i Louis Pasteur otvoren put novim mogućnostima za one koji su bili zainteresirani za biološko oružje, budući da se je omogućilo biranje, ali i mogućnost kreiranja svojstava poželjnih agenasa kao patogena (npr. putem genetičkog inženjerstva). Najčešće metode uporabe takvih agenasa u povijesti su poprimale tri glavna oblika, a to su bili: namjerno trovanje vode i hrane zaraznim materijalom (primjerice bunari), upotreba mikroorganizama, toksina, živih ili mrtvih životinja u različitim sustavima oružja te upotreba biološki inokuliranih tkanina. Najraniji povijesni zapisi koji svjedoče o namjeri korištenja biološkog oružja su hetitski tekstovi koji datiraju iz razdoblja od 1500. do 1200. p. n. e. u kojima se opisuje kako su se osobe koje su болоvale od kuge namjerno tjerale u područja pod neprijateljskom kontrolom. U poznatim spjevovima Ilijadi i Odiseji spominju se primjeri umakanja vrhova koplja i strelica u otrov. Poznato je i da su skitski streljari koristili umakali svoje strijele u zmijski otrov, ljudsku krv i životinjski izmet kako bi uzrokovali rane koje bi se lako inficirale (Mayor, 2003).

U stepama istočne Azije obitavaju mali glodavci koji su bili prenosioci uzročnika bubonske kuge – poznate i po nazivu “crna smrt” u srednjovjekovnoj Europi.

Mongoli, koji su bili poznati po najmobilnijoj vojnoj sili ikad vi enoj u tada poznatom svijetu (srednji vijek), su uspostavili svojim osvajanjima političke, vojne i trgovačke veze između Istoka i Zapada, no uspjeli su i uspostaviti neprekinuti lanac infekcije sve do Europe, gdje se ljudi i životinje sa takvim tipom bolesti još nisu bili susreli. Ta “crna smrt” je desetkovala gotovo polovinu stanovništva tadašnje Europe, nepovratno promijenivši tok europske i azijske povijesti. Tijekom napada, mongolske su se snage znale koristiti mrtvim tijelima žrtava kuge i ekskrementima koje bi katapultima prebacivali preko zidina grada koji je bio pod opsadom, ne bi li pokušali prenijeti zarazu u gradsko stanovništvo (Wheelis, 2002). Također, u sljedećem svrhu se je i njemački car Friedrich I. Barbarossa u 12. stoljeću u bitci kod Tortona koristio mrtvim tijelima poginulih vojnika kako bi kontaminirao bunare pitke vode. Britanska vojska je tijekom francusko-engleskoga rata (1754.-1767.) u Sjevernoj Americi indijanskim plemenima koji su podupirali Francuze podijelila pokrivke kojima su se koristili oboljeli od velikih boginja što je dovelo do velike epidemije i pomora domorodnog stanovništva. Mišljenje povjesničara je da je upravo ta epidemija imala ključnu ulogu u ishodu rata. Još jedan sljedivi primjer vezan uz sjevernoameričko područje se je odvijao za vrijeme američkoga građanskog rata 1863. godine (Frieschnecht, 2003), kada je izvjesni kirurg konfederacijskih snaga bio uhićen i optužen za pokušaj unošenja odjeće zaražene žutom groznicom na sjever SAD-a (područje pod unionističkim snagama).

Tablica 1: Primjeri biološkog oružja korištenog tijekom proteklog tisućljeća (preuzeto i prilagođeno na temelju Frischknecht, 2003).

Godina	Događaj
1155.	Car Barbarosa kontaminira bunare ljudskim leševima (Tortona, Italija)
1346.	Mongoli katapultiraju leševe žrtava kuge preko gradskih zidina Feodosije (poluotok Krim, današnja Ukrajina)
1495.	Španjolci miješaju vino sa krvlju pacijenata zaraženih gubom da bi ga prodali francuskim kupcima (Napulj, Italija)
1650.	Poljaci upotrebljavaju slinu bijesnih pasa u streljivu koje ispaljuju prema svojim neprijateljima
1675.	Prvi dogovor između Nijemaca i Francuza o izbjegavanju korištenja tzv. “otrovnog streljiva”
1763.	Britanci dijele američkim urođenicima pokrivke koje su koristili ljudi oboljeli od velikih boginja
1797.	Napoleon daje poplaviti ravnice oko Mantove (Italija) kako bi potaknuo širenje malarije
1863.	Pripadnici Konfederacijske vojske (Američki građanski rat) prodaju pripadnicima unionističke vojske odijela od pacijenata sa žutom groznicom i velikim boginjama

Početkom 20. stoljeća uporaba biološkog oružja na ljudima i životinjama postala je sofisticiranija. Nijemci su za vrijeme Prvog svjetskog rata razvijali i koristili uzročnike antraksa (uzgojene su spore u svrhu zaražavanja stoke), sakagije (korišteni za

zaražavanje francuske konjice), kolere i nekih bolesti žitarica za biološko ratovanje. Japanci su se posebice u razdoblju ekspanzionističke politike od 1937. do 1945. godine bavili razvijanjem programa za proizvodnju biološkog oružja. Građena su postrojenja u Kini i Mandžuriji, a ispitivanja su obavljana na ljudima, mahom kineskim zatvorenicima. Pretpostavlja se da je više od 3000 zatvorenika bilo izloženo uzročnicima kuge, antraksa, sifilisa te ostalim biološkim agensima. Japan je 1937. godine u Pingfanu u Mandžuriji u laboratorijskom kompleksu nazvanom Jedinica 731 započeo program proizvodnje biološkog oružja. Istraživanja su se nastavila do 1945. godine kada je general dr. Shiro Ishii, idejni osnivač centra kasnije osuđen za ratne zločine, naredio da se spalji do temelja. Prema izvješćima koje je izradio poslije Drugog svjetskog rata dr. Edwin Hill, američki znanstvenik zadužen za istraživanje biološkog oružja u Jedinici 731 izvedeno je oko 1000 autopsija i uglavnom se radilo o slučajevima ljudi izloženima aerosolu antraksa. Krajem 1945. godine Japanci su raspolagali sa zalihama od oko 400 kg antraksa namijenjenog za uporabu u specijalnim bombama. Godine 1940. u Kini i Mandžuriji su nakon prelijetanja japanskih zrakoplova zabilježene epidemije bubonske kuge. Zaražene buhe izbacivane su zajedno sa žitom namijenjenim štakorima koji su trebali poslužiti kao prijenosnici buha u ljudske zajednice (Williams, 1989).

SAD su 1943. godine u Camp Detricku (sada Fort Detrick) osnovale Institut za istraživanje zaraznih bolesti i otpočele program uporabe biološkog oružja za ofanzivne svrhe. Program je bio odgovor na njemačku proizvodnju takvog oružja, a potaknula su ga i japanska istraživanja. Istraživanja i proizvodnja trajali su do 1969. godine kada je američki predsjednik Richard Nixon konačno zaustavio taj program. Štoviše, SAD su sa tadašnjim SSSR-om potpisale 1972. godine Konvenciju o zabrani razvoja, proizvodnje i skladištenja bakteriološkog oružja i toksina. Potpisnice su se obvezale da će Ujedinjenim narodima proslijediti podatke o postrojenjima za istraživanje biološkog oružja, znanstvenim konferencijama, razmjeni znanstvenika i podataka te o slučajevima epidemija. Sve su zalihe biološkog oružja uništene 1973. godine (među ostalima *Bacillus anthracis*, botulinski toksin, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, virus venecuelanskog encefalitisa, *Brucella suis* i stafilokokni enterotoksin B), izuzev onih koje se koriste u istraživanjima (Poupard et al., 1992). U SAD-u je tzv. program uporabe biološkog oružja u defenzivne svrhe započeo 1953. godine i traje do danas pod nazivom "United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases" (ili skraćeno USAMRIID).

Općenito govoreći, biološko oružje danas je relativno lako nabaviti, uzgojiti i upotrijebiti. Mala količina takvog oružja može u urbanom području ubiti stotine tisuća ljudi što skrivanje, transport i diseminaciju čini osobito zahtjevnom djelatnošću. Dodatna prednost takvog oružja je što se od njega teško zaštititi jer je nevidljivo, bez mirisa i okusa, pa raspršivanje može proći i posve nezapaženo. U međunarodnoj uporabi su simboli koji upućuju na prisutnost biološki opasnog materijala (vidi Slika 1).

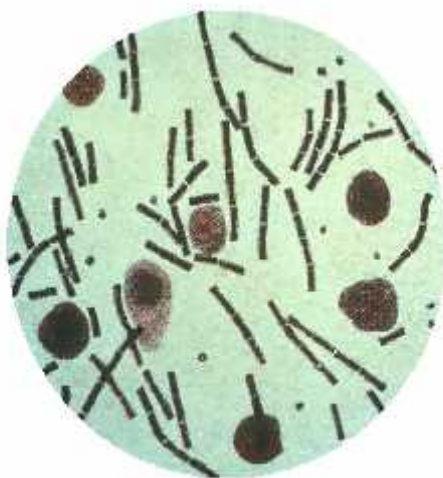


Slika 1: Međunarodni simbol za biološku opasnost (preuzeto sa <http://en.wikipedia.org/>)

3 Bakterijske vrste kao biološko oružje

3.1 *Bacillus anthracis*

B. anthracis je Gram-pozitivna sporulirajuća aerobna štapičasta bakterija (Slika 2), duljine od 1 do 9 μm , uzročnik bolesti antraksa (drugi nazivi bedrenica, crni prišt). Endemična je u tropskim i suptropskim krajevima. Spore u isušenom stanju mogu biti stabilne desetljećima. Primjerice, u toku Drugog svjetskog rata britanska vojska je eksperimentirala sporama antraksa na jednom izoliranom otoku blizu škotske obale (otok Gruinard), kontaminirajući ga, a do konačne dekontaminacije je došlo tek 1990. (Cole, 1990). Preživljiva i (goveda, koze, ovce, konji) su najviše prijemljivi za bolest, a najčešće se zaraze jer mogu pojesti spore koje su prisutne na travi. Cijepljenje životinja i uklanjanje bolesnih i zaraženih znatno je smanjilo učestalost obolijevanja od antraksa. No bez obzira na to, spore antraksa mogu se naći i na uzorcima tala u cijelom svijetu.



Slika 2: *B. anthracis* obojen po Hissu (preuzeto sa <http://de.wikipedia.org/>)

B. anthracis je ujedno i značajna bakterija u povijesti mikrobiologije, budući da je Robert Koch 1876. upravo na njoj po prvi puta znanstvenom metodom dokazao uzročnika bolesti. Jedina je poznata bakterija koja sintetizira vlastitu proteinsku kapsulu (sastavljena od D-poliglutaminske kiseline). Ta kapsula omogućuje da izbjegne fagocitozu u domaćinskom organizmu. Također, jedina je patogena bakterija koja nosi

svoj vlastiti faktor virulencije, tzv. toksin antraksa ili bedrenice (gr . α = ugljen; označava tvorbu na koži koje se javljaju tijekom bolesti, a koje su crne boje). Toksin bedrenice uzrokuje tvorbu edema i djeluje smrtonosno na domaćina. On ima 3 faktora virulencije (tzv. proteinska faktora):

- zaštitni antigen (tzv. cell-binding protein)
- edemski faktor
- letalni faktor.

Sve ove proteinske komponente u sinergisti komu u inkubaciji vode ka stanoj smrti kroz kaskadu različitih enzimatskih reakcija, a bakterijskim stanicama omogućuju da napadnu imunološki sustav, da se umnožavaju i naposljetku, dovedu i do smrti zaraženog organizma. Proizvodnja ovog toksina je vezana uz plazmid koji se uništava zagrijavanjem pri temperaturi od 42,5 °C (Madigan et al., 2000).

Kako zapravo bedrenica kao bolest otpočinje, ne zna se pouzdano. Međutim, uzročnik ove zoonoze (bolesti koju mogu prenijeti životinje na čovjeka i obrnuto) ulazi u organizam na tri različita načina, a to su kožni, gastrointestinalni i inhalacijski. Kožni način, koji je najrjeđi i u životinja, ali najčešći u ljudi (95% infekcija) rezultira kontaktom izmeću spora bakterije i neke rane na koži. Isprva se javlja crveno-smeđa kvržica, a nakon nekoliko dana se javlja crvenilo i želatinozna otekлина, da bi sve rezultiralo otvorenim čirom iz koje izlazi sukrvica, odnosno stvaranjem crne kraste (odakle i naziv "crni prišt"). U blizini se obično javlja povećanje limfnih čvorova, a zaražena osoba može osjetiti malaksalost, bolove u mišićima, glavobolju, popraćeno uz vrućicu i povraćanje. Ukoliko se bolest na vrijeme počinje liječiti antibioticima (prvenstveno kinolonske, odnosno penicilinske skupine), dolazi do potpunog ozdravljenja, međutim, neliječeni slučajevi mogu završiti i smrću. Inhaliranjem (primjerice spora antraksa) javljaju se početni simptomi koji mogu nalikovati na gripu, no nakon nekoliko dana pogoršava se opće stanje organizma, javljaju se problemi s disanjem, plućne embolije te vrlo brzo šok i gubitak svijesti. Ovakav, plućni ili inhalacijski oblik antraksa je najsmrtonosniji. Ipak, gledajući sa stajališta propagacije kao biološkog oružja, nije jednostavno naći velike količine endospora u aerosolu koji bi bio pogodan za raspršivanje jer ti postupci iziskuju vrlo veliku stručnost pojedinaca i izrazito kvalitetnu opremu za rad. Crijevni ili gastrointestinalni oblik obično nastaje nakon konzumacije zaraženog mesa (sadržava endospore) i najmanje je proširen (zbog poboljšanja higijenskih standarda u svijetu). Mogu se javiti ulcerozne tvorevine u jednjaku (čirevi), ali se uvijek javljaju mučnina i povraćanje, zatim jaki bolovi u trbuhu,

povraćanje krvi, jaki proljev, te konačno može doći i do sepse.

Zbog svih ovih razloga, kao i zbog činjenice da nije dokazan prijenos s ovjeka na ovjeka, već do zaraze dolazi samo kod osoba koje su bile izložene sporama, ovaj bacil se smatra idealnim kandidatom za biološko oružje. Njegova prva primjena u tu svrhu datira još iz doba Prvog svjetskog rata u Finskoj 1916. godine, kada su ga pojedine skandinavske terorističke skupine koristile u borbi za finsku nezavisnost protiv ruske carske vojske (Bisher, 2003). Eksperimentiralo se i na već spomenutom otoku Gruinard sa stvaranjem prve prave biološke bombe (poput neke vrste kazetne bombe sa sporama bacila), tzv. N-bombe (ime agens N je koristila američka vlada kao oznaku ovog bacila). Vlada nepriznate države Rodezije u Africi u periodu 1978.-1979. se koristila bacilima antraksa tijekom rata sa crnim nacionalistima, i to protiv ljudi i stoke (<http://www.sardc.net/>). Ne tako davno, to nije 2001. godine, nakon velikih terorističkih napada na SAD, spore bacila su se koristile u bioterističke svrhe, i to putem poštanskih pošiljaka koje su sadržavale koncentrirane spore ovog bacila, što je rezultiralo zarazom 22 osobe i 2 smrtna slučaja.

3.2. *Burkholderia* sp.

Burkholderia je rod proteobakterija najpoznatiji po svoje dvije patogene vrste koje se mogu upotrijebiti u svrhu biološkog oružja. To su Gram-negativne, pokretne, obligatno aerobne štapiaste bakterije, a ovaj rod je dobio ime po Walteru H. Burkholderu, biljnom patologu sa Sveučilišta Cornell u SAD-u.

Burkholderia mallei, uzročnik je sakagije, bolesti koja se obično javlja u konja, magaraca i sl., ali se mogu zaraziti i psi i mačke, putem kontaminirane hrane ili vode. Zbog svoje sposobnosti da inficira ljude smatra se zoonozom, a prijenos se javlja putem izravnog kontakta kroz ozljede na koži, zatim kroz nosne i usne mukozne površine, ili udisanjem. Simptomi bolesti obično uključuju stvaranje čvorova u plućima i ireverzibilnu upalu gornjim dišnim putevima. Javlja se kašalj, vrućica, infektivni iscjedak iz nosa, a, ukoliko nije liječeno, može nastupiti i sepsa te, konačno, smrt. Ova je bolest endemična za Afriku, Aziju, Bliski Istok, Središnju te Južnu Ameriku, dok je iskorijenjena iz Sjeverne Amerike, Australije i većeg dijela Europe putem nadzora i uništavanja zaraženih životinja, odnosno materijala te ograničenja prilikom uvoza. Tijekom Prvog

svjetskog rata, njemački su agenti namjerno širili ovu bolest kako bi zarazili što veći broj ruskih konja i mula na Istočnom bojištu. U SAD-u se je svojevremeno odustalo od aktivne uporabe ove bakterije kao biološkog oružja zbog činjenice da je neobjašnjivo gubila virulenciju u laboratorijskim uvjetima (Ellison, 2008).

Burkholderia pseudomallei, uzročnik je melioidoze, bolesti koja ima stopu smrtnosti od 20 do 50%, čak i ukoliko se podvrgne liječenju. Bakterija je prisutna u vodi i tlu. Raste u aerobnim uvjetima na neselektivnim hranjivim podlogama te stvara hrapave ili glatke sluzave kolonije sivožute boje, okruglog oblika koje mogu narasti za 72 sata. Kolonije imaju miris gnoja ili zemlje. Na krvnom agaru ova bakterija izaziva hemolizu (Slika 3). Oboljenje je trenutno prisutno u jugoistočnoj Aziji, a manjim dijelom u nekim europskim zemljama (Francuska) i sjevernoj Australiji. Rezervoari infekcije su domaće životinje (kopitari, koze, svinje, ovce itd.), neki sisavci (kao što su glodavci i majmuni), feces, tlo itd. Infekcija nastaje direktnim prijenosom izmeću životinja, ingestijom uzročnika, ubodom kukaca, preko oštećene kože ili udisanjem uzročnika. Nakon ulaska uzročnik se krvlju raznosi po organizmu i uzrokuje gnojnu upalu i apscese u većini unutrašnjih organa.



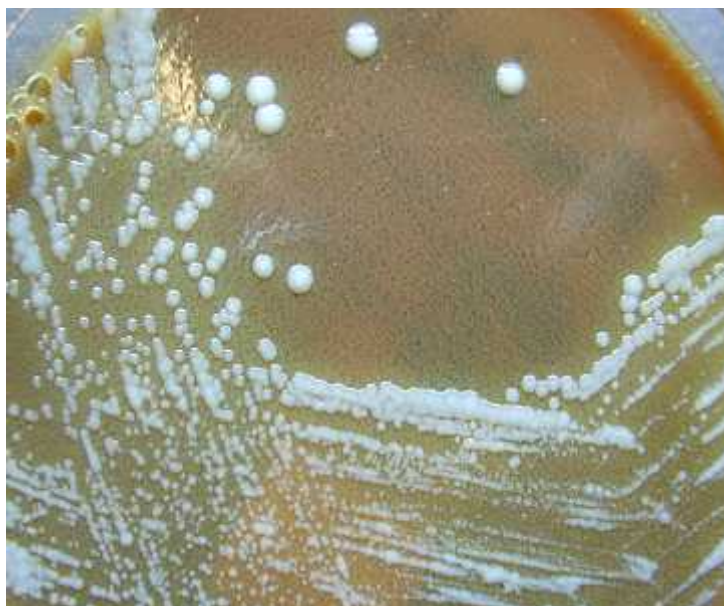
Slika 1: *Burkholderia pseudomallei* na krvnom agaru

Ukoliko uzročnik uđe u organizam preko oštećene kože na mjestu ulaska se stvaraju čvorovi, a uzročnik dalje prodire u krvotok. U plućima nastaju lezije sa

stvaranjem plućnih apscesa, a na pleuri se razvija fokalni adhezivni pleuritis. Terapija uključuje antibiotike, najčešće cefalosporine treće generacije, penicilin, kloramfenikol ili trimetoprim-sulfametoksazol. Ova se bakterija, iako smatrana potencijalnim biološkim oružjem, nije kao takva i razvijala pod, primjerice, američkim programom razvoja bio-oružja (Ellison, 2008).

3.3. *Francisella tularensis*

To je patogena vrsta Gram-negativnih bakterija, a uzročnik je tularemije ili zečje groznice. Bakterija je prvi puta izolirana iz svježeg mesa 1911. u okrugu Tulare, Kalifornija u SAD-u (po kojem je i dobila ime). Fakultativno može biti i unutarstanični parazit. Zbog jednostavnog širenja putem aerosola i visoke virulentnosti, smatra se vrlo opasnim agensom biološkog oružja.



Slika 4: Kolonije bakterije *Francisella tularensis*
(preuzeto sa <http://en.wikipedia.org/>)

F. tularensis (Slika 4) prvenstveno zaražava male sisavce poput voluharica, ondatri, zečeva, ali i ljudi. Ipak, do sada nije zabilježen slučaj izravnog prijenosa među ljudima. Bakterija se širi vektorima poput krpelja ili komaraca, ili izravnim kontaktom sa zaraženom životinjom. Infekcija se dešava na nekoliko načina. Najopasniji je onaj putem kože (time nastaje ulceroglandularni oblik bolesti), a udisanjem posebnog

soja se može razviti smrtonosni oblik tularemije – plu na tularemija. Ova bakterija može preživjeti izvan doma inskog organizma tjednima, a na ena je u vodenom okolišu, travnjacima i plastevima sijena. Osoba se može lako zaraziti i prilikom košnje trave, ukoliko se na e raspršena u zraku (stoga se bolest naziva još i “boleš u kosaca”).

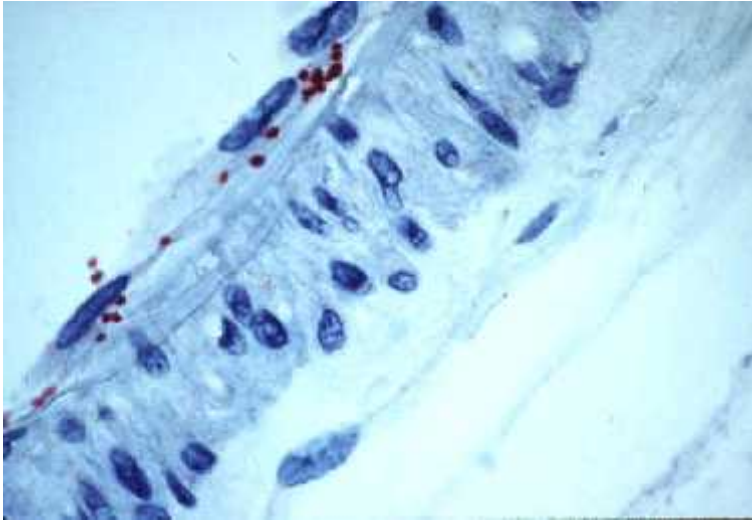
F. tularensis zaražava mnoge vrste stanica, ipak to radi prvenstveno na makrofagima, u koje ulazi fagocitozom, nakon ega izlazi u citosol gdje se ubrzano umnožava, a stanica ulazi u programiranu smrt – apoptozu. Zatim slijedi otpuštanje novih bakterijskih stanica sposobnih za infekciju.

Ova bakterija je pogodan patogen za biološko oružje iz nekoliko razloga, a neki od njih su da se jednostavno može raspršiti putem aerosola, visoke je infektivnosti (dovoljno je otprilike 10 do 50 bakterijskih stanica za uspješnu zarazu), nije perzistentna (tj. dekontaminacija je jednostavna, za razliku od *B. anthracis*) te u inkovito onesposobljava zaražene pojedince. Protiv ove bakterije ne postoji vakcina dostupna široj populaciji, a ina e se lije i streptomycinom. Tijekom šezdesetih godina prošloga stolje a SAD su u sklopu svoga programa razvoja biološkog oružja uspjele na initi jednu vrstu kazetne bombe sa teku im infektivnim materijalom ove bakterije. Poseban soj korišten za tu namjenu, Schu S4 (poznat i pod nazivom agens UL), je bio otporan na antibiotik streptomycin, a o ekivana stopa smrtnosti (ukoliko bi bio upotrijebljen kao oružje) je bila izme u 40 i 60% (Ellison, 2008).

3.4. Rickettsia sp.

To je rod nepokretnih, Gram-negativnih, nesporuliraju ih i pleomorfnih bakterija (što zna i da su prisutne u mnoštvo oblika – koki, bacili i nitasti oblici). Sam rod je dobio naziv po Howardu Tayloru Rickettsu, ameri kom patologu iz kraja 19. i po etka 20. stolje a koji je uspio izolirati uzro nika pjegave groznice, bolesti koju izaziva *Rickettsia rickettsii* (Slika 5; na kraju je i sam podlegao istoj bolesti). Zanimljivo za rikecije je to da su obligatni unutarstani ni paraziti pa njihova opstojnost izravno ovisi o ulasku, rastu i umnožavanju unutar doma inskih stanica (tipi no stanice endotela). Zbog toga se na eš e prenose od životinje do životinje putem vektora, tipi no kukaca (ušima, krpeljima, buhama). U prošlosti su ih zbog ovoga svrstavali u posebnu skupinu izme u virusa i bakterija. Stanice rikecija ulaze u doma insku stanicu aktivno, što zna i da doma inski organizam mora biti živ i metaboli ki djelotvoran. Jednom kada rikecija u e

u fagocite, umnožava se prvenstveno u citoplazmi sve dok se domaćinska stanica u potpunosti ne ispuni parazitima. Nakon toga slijedi pucanje stanice i oslobađanje bakterija u okolnu tekućinu (Madigan et al., 2000).



Slika 5: *Rickettsia rickettsii* (preuzeto sa <http://en.wikipedia.org/>)

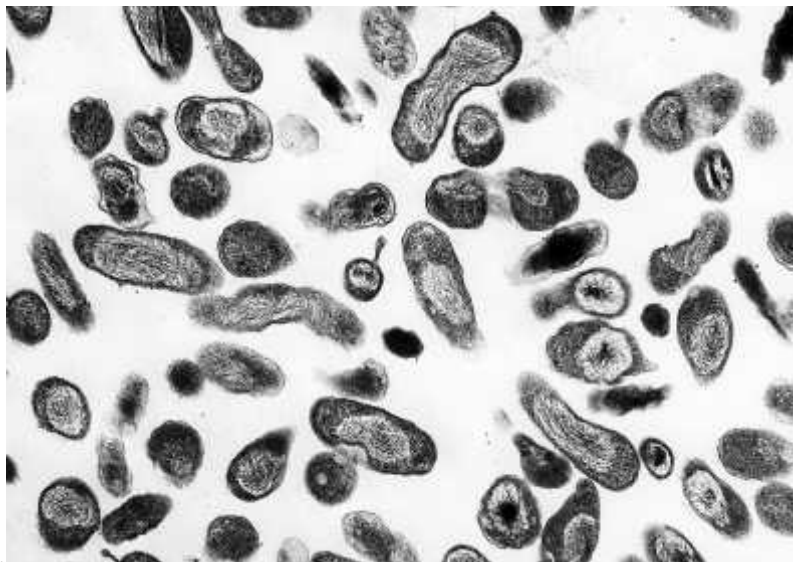
Rickettsia prowazekii je uzročnik epidemijskog tifusa, a prenosi se od čovjeka do čovjeka putem uši. Ova bolest može biti izuzetno opasna po ljude. Primjerice, tijekom Prvog svjetskog rata, tifusna se epidemija proširila istočnom Europom, a zbog nje je život izgubilo oko 3 milijuna ljudi. Epidemijski tifus može biti također vrlo problematičan za vojne trupe tijekom ratnih razdoblja, jer se zbog nesanitarnih uvjeta uši vrlo lako šire među vojnicima. Stanice *R. prowazekii* prolaze kroz kožu nakon što uši ugrizom stvore rupu koju kontaminiraju svojim izmetom (glavni izvor rickettsijskih stanica). Tijekom inkubacijskog perioda od 1 do 3 tjedna, organizam se umnožava u žilnom endotelu. Nakon toga počinju se javljati prvi simptomi tifusa, a to su vrućica, glavobolja i malaksalost. Poslije 5 do 9 dana od pojave prvih simptoma, javlja se karakterističan osip u području pazuha te se širi cijelim tijelom osim lica, dlanova i stopala. Komplikacije koje mogu proizaći iz ove bolesti uključuju oštećenja središnjeg živčanog sustava, pluća, bubrega i srca. Ovakav tifus ima stopu smrtnosti od 6 do 30%. Protiv *R. prowazekii* su najučinkovitiji antibiotici tetraciklin i kloramfenikol (Madigan et al., 2000).

Rickettsia rickettsii je uzročnik pjegave groznice Stjenjaka (tzv. "Rocky Mountains spotted fever"). Najčešće se prenosi putem šumskih krpelja (npr. *Dermacentor andersoni*), koji je sličan kao i u slučaju *R. rickettsii*, šire kombinacijom

ugriza (ozljeda na koži) i izmeta (najveća koncentracija bakterija). Specifična je za područje obaju Amerika, a u ostalim dijelovima svijeta je prilično nepoznata te se bolest krivo dijagnosticira. Stanice *R. rickettsii*, za razliku od drugih rikecija, rastu ne samo u citoplazmi domaćinske stanice, već i unutar jezgre. Poslije perioda inkubacije koji traje od 3 do 12 dana, naglo se javljaju prvi simptomi, poput jakih glavobolja i vrućice. Nakon 3 do 5 dana od pojave prvih simptoma, javlja se osip koji je primjetan na dlanovima i stopalima (položaj osipa može biti i od dijagnostičkog značenja). Javljaju se i probavne smetnje, poput proljeva i povraćanja, a ovi simptomi mogu ostati i preko 2 tjedna ukoliko se bolest ne liječi. Ako se rano primijene, tetraciklin i kloramfenikol mogu biti učinkoviti antibiotici u suzbijanju ove bolesti. Pjegava groznica Stjenjaka je ozbiljna i potencijalno smrtonosna bolest i, unatoč učinkovitom liječenju 3 do 5% pojedinaca zaraženih ovom bolešću umre (Madigan et al., 2000).

3.5. *Coxiella burnetii*

Ova je bakterija uzročnik Q groznice, bolesti koja se obično pojavljuje naglim početkom - vrućicom, glavoboljom i intenzivnim znojenjem, a može je pratiti i upala



plu a.

Slika 6: *Coxiella burnetii* (preuzeto sa <http://en.wikipedia.org/>)

U obliku spora otporna je na toplinu, tlak, isušivanje i određene antiseptike. Iako spada u porodicu *Rickettsiaceae*, ovo nije prava rikecija. Obligatni je unutarstanični parazit (Slika 6), a u prirodi se može naći i u zraku. Iako ova bakterija pokazuje malu virulentnost (samo oko 50% zaraženih može pokazati simptome), visoke je infektivnosti jer je samo jedna stanica sposobna uzrokovati bolest. Kao potencijalno biološko oružje, ova je bakterija također jedan od odličnih kandidata, ne samo zbog visoke infektivnosti, već i zbog činjenice da se lako prenosi putem aerosola. Samo nekih 1 do 2% zaraženih pojedinaca umire od ove bolesti; bolest je u načelu lako izlječiva korištenjem antibiotika doksiciklina (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/qfever/>). Američka vojska je tijekom pedesetih i šezdesetih godina proteklog stoljeća, u programu poznatim pod nazivom "Operation Whitecoat" provodila medicinske eksperimente na dobrovoljcima koji su zbog savjesti odbili služiti vojni rok (prvenstveno pripadnicima Adventističke crkve) koristeći se upravo ovim agensom i to tako što su ga raspršivali po ljudima u aerosolnom obliku sa udaljenosti od otprilike 1 kilometra (Madigan et al., 2000).

4 Bakterijski toksini - biološko oružje

Osim bakterijskih stanica kao patogenih organizama, za biološko oružje mogu poslužiti i toksini (supstance koje proizvode bakterije, a koje i same imaju slične patogene učinke na organizme u kojima djeluju). Bakterije proizvode različite vrste toksina koje možemo podijeliti u dvije osnovne skupine, a to su endotoksini i egzotoksini. Endotoksini su sastavni dijelovi lipopolisaharidne ovojnice (dijelovi stijenke Gram-negativnih bakterija), a egzotoksini su proteini koje bakterijske stanice luče u okoliš. Potonji su bitni kao biološko oružje, primjerice enterotoksin i botulinski toksin (spadaju u skupinu egzotoksina), o kojima ćemo biti nešto više riječi u nastavku.

4.1. Stafilokokni enterotoksin B

To je enterotoksin (proteinski toksin kojega bakterije proizvode te izlučuju u tanko crijevo gdje obitavaju kao mikroflora, uzrokujući obilato otpuštanje tekućine u lumen i, samim time proljev) kojeg proizvodi bakterija *Staphylococcus aureus*. Uobičajeni je uzrok trovanja hranom, a posljedice (proljev, mučnina, te grčevi) se osjećaju već nekoliko sati od konzumacije hrane. Prilično je stabilan (otporan je na kuhanje pri 100°C kroz nekoliko minuta). Njegova uporaba kao biološko oružje datira od Drugog svjetskog rata, kada su ga američke obavještajne službe koristile u borbi protiv nacističkih vojnika u sjevernoj Africi (Ellison, 2008).

Ovaj enterotoksin se može lako prenijeti u aerosolni oblik i kao takav je prilično stabilan. *S. aureus* je gotovo sveprisutna bakterija koju se lako može uzgojiti. Ima prilično brzo djelovanje, kao i relativno visoku smrtonosnu dozu, što ga čini prilično atraktivnim za vojne svrhe. To na dijagnozu napada ovim toksinom je prilično komplicirano, obzirom da nema jasnih simptoma ili točno određenih testova na taj toksin pa se može pobrkati sa simptomima ranih faza antraksa ili tularemije. Testovi u SAD-u 1968. godine su pokazali da se aerosolom raspršenim iz letjelice može prekriti površina jednaka dvama gradskim područjima Los Angelesa, a moglo bi biti zahvaćeno oko 30% ekvivalentnog iznosa populacije (<http://www.cbwinform.com/>).

4.2. Botulinski toksin

Botulinski toksin proizvodi bakterija *Clostridium botulinum* u anaerobnim uvjetima. Ova bakterija nastanjuje tlo i sedimente, me utim može rasti i proizvoditi toksin u nepropisno konzerviranoj hrani pa konzumacija takve hrane može uzrokovati otrovanje. Stopa smrtnosti takvog otrovanja može iznositi i do 100% u nelije enih pojedinaca, a smrt obi no nastupa zbog respiratornog kolapsa uzrokovanog miši nom paralizom. Naime, toksin djeluje tako da se veže na presinapti ke membrane na završecima stimulatornih motori kih neurona na neuromiši noj vezi, sprje avaju i otpuštanje acetilkolina, spoja koji prijenosi signal od živaca do miši a. Ovaj toksin je zapravo multikomponentna struktura, a sastoji se od glavnog proteina molekulske mase 150 kDa, koji stvara komplekse sa drugim, netoksi nim proteinima, što u kona nici ima za posljedicu stvaranje bioaktivnog toksi nog kompleksa molekulske mase oko 1 GDa. Devedesetih godina prošlog stolje a religijski kult poznat pod nazivom Aum Shinrikyo je u tri navrata u Japanu pokušao upotrijebiti botulinski toksin u aerosolnom obliku kao sredstvo teroristi kog napada, a pojedine države (kao Japan, Južnoafri ka Republika, bivši SSSR i Irak) su se bavile istraživanjem i razvojem ovog agensa kao biološkog oružja (http://www.globalsecurity.org/wmd/intro/bio_botulinum.htm).

5 Literatura

- Bisher J. (2003). During World War I, Terrorists Schemed to Use Anthrax in the Cause of Finnish Independence, *Military History*, 1:17-22.
- Cole L. A. (1990). *Clouds of Secrecy: The Army's Germ Warfare Tests Over Populated Areas*, Rowman and Littlefield, Lanham, Maryland (USA).
- Ellison H. (2008). *Handbook of Chemical and Biological Warfare Agents*, CRC Press, Boca Raton, Florida (USA).
- Frischknecht F. (2003). The history of biological warfare, *EMBO Reports*, 4: 47-52.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall International, Upper Saddle River, New Jersey (USA).
- Mayor A. (2003). *Greek Fire, Poison Arrows & Scorpion Bombs: Biological and Chemical Warfare in the Ancient World*, Woodstock, New York (USA).
- Poupard J. A., Miller L. A. (1992). History of Biological Warfare: Catapults to Capsomeres, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 666: 9-19.
- Wheelis M. (2002). Biological warfare at the 1346 siege of Caffa, *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 971-975.
- Williams P. (1989). *Unit 731: Japan's Secret Biological Warfare in World War II*, Free Press, London (UK).

<http://de.wikipedia.org/>

<http://en.wikipedia.org/>

<http://www.cbwinfo.com/Biological/Toxins/SEB.html>

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/qfever/>

http://www.globalsecurity.org/wmd/intro/bio_botulinum.htm

<http://www.sardc.net/editorial/sanf/2001/iss21/specialreport.html>

6 Sažetak

Biološko oružje je namjerna uporaba bilo kojeg patogenog mikroorganizma (bakterija, virusa, gljivica ili praživotinja) kao sredstvo ratovanja (onesposobljavanja ili usmrivanja pojedinaca, bilo vojnih ili civila te uništavanja gospodarski ili vojno značajnih životinjskih ili biljnih vrsta), odnosno zastrašivanja (bioterorizam). Razvoj i skladištenje biološkog oružja su po Konvenciji Ujedinjenih naroda iz 1972. godine, koju je do sada potpisalo preko stotinu zemalja, proglašeni ilegalnim. Patogene bakterije, imaju široku primjenu u ovim svrhama, što je i povijesno pokazano. Bakterije mogu poslužiti kao uzročnici bolesti (zbog lakog širenja među populacijom i visoke infektivnosti te mogu nositi lakog i dugotrajnog pohranjivanja) ili kao proizvođači određenih supstanci koje mogu djelovati toksično (bakterijski enterotoksini).

7 Summary

Biological weaponry is the deliberate use of any pathogenic microorganism (bacteria, viruses, fungi or protozoa) as a means of warfare (disabling or killing of individuals, whether military or civilian, and destruction of economic or military significant animal or plant species) or intimidation (bioterrorism). Development and storage of biological weapons was declared illegal by the United Nations Convention of the year 1972, which has so far been signed by over a hundred countries. Pathogenic bacteria are widely used to these purposes, as it is historically shown. Bacteria might be employed as a cause of disease (due to the facilitated transmission among the population and high infectivity as well as the possibility of easy and long-term storage), and as producers of certain substances that can act in a toxic manner (bacterial enterotoxins).